云 南 植 物 研 究 1989; 11(3): 239—246
Acta Botanica Yunnanica

抗玉米素核苷的单克隆抗体制备及内源玉米素核苷的酶联免疫吸附测定

张 龙 季本仁 段金玉

(中国科学院昆明植物研究所，昆明)

摘要 通过二次成功的细胞融合，共获得三株分泌抗玉米素核苷（ZR）单克隆抗体的稳定杂交瘤系F_2E_6、F_3G_6和F_1B_9。其中F_2E_6分泌的单抗属IgG_1、F_3G_6、F_1B_9 分泌的单抗均属IgM。以F_2E_6、F_3G_6单抗为基础的ELISA对ZR的检测灵敏度为0.05pmol(—18pg)，线性检测范围为0.05—50pmol。除玉米素(Z)外，F_2E_6、F_3G_6单抗与IPA、6-BA、KT和腺苷几种ZR类似物的交叉反应值都小于0.18%。用ELISA测定F_2E_6单抗与ZR反应的亲和常数为$2.36 \pm 0.99 \times 10^{-8}$M。本文还报道了包埋抗原的ELISA在植物内源细胞分裂素测定中的应用，并用此方法测定了黄化玉米（*Zea mays* L.）幼苗中ZR的含量。

关键词 细胞分裂素；玉米素核苷；单克隆抗体；酶联免疫吸附测定法

细胞分裂素的ZR在促进细胞分裂、调控植物生长发育中起着重要作用，弄清植物体内ZR的含量及其动态变化，无论对整体水平上控制植物的生长发育、还是在离体条件下控制细胞分化和脱分化，以及对激素的运输、代谢等的研究都有重要的意义。目前，植物激素的测定方法大体可分为生物试法、物理化学试法和免疫试法三大类[1]。免疫试法因其具有快速方便、特异敏感等优点，逐渐受到重视。特别是近几年人们[2—5]把单克隆抗体技术应用到植物激素的免疫测定中，取得可喜的成绩。Trione[4]和Eberle[5]等获得的抗ZR的单克隆抗体与相应的多抗相比，虽对N-6位衍生物的交叉反应值有明显的降低，但与玉米素的交叉反应仍较高，要与高压液相色谱（HPLC）结合起来才能测定ZR的含量。我们结合本实验室的条件，对抗ZR的McAb的制备及特性进行了研究，并报道了包埋抗原的ELISA在细胞分裂素测定中的应用。

材料和方法

1.植物和动物材料

新收获的玉米（*Zea mays* L.）种子，用蒸馏水反复冲洗后浸泡24小时，播种到浸湿的滤纸上，置28℃培养室培养4天后，即可用做实验材料。免疫用BALB/c鼠来自昆明动物所和医学生物所。

2.免疫原的制备

1988-08-31收稿

用改良的Erlanger[6]的过碘酸氧化法把ZR偶联到牛血清白蛋白（BSA）上，每分子BSA偶联3—4个ZR分子。

3.兔抗鼠免疫球蛋白抗体的酶标

收集正常BALB/c鼠血清，用45%饱和度的硫酸铵沉淀鼠球蛋白，再根据Ey等人[7]的方法用Protein A-Sepharose CL-4B亲和纯化鼠球蛋白，经PAGE检测达电泳纯，再用纯化的鼠免疫球蛋白免疫家兔，制备兔抗鼠球蛋白抗血清，血清中球蛋白经Hurn[8]方法粗纯化后，过二次DEAE-Cellulose A_{52}柱纯化。

用戊二醛二步法[9]把辣根过氧化物酶（HRP，上海生化所，RZ＞3）偶联到纯化的兔抗鼠球蛋白抗体上，经光谱扫描证明已偶联上HRP，偶联率为HRP：IgG＝27：1000。

4.酶联免疫吸附测定（ELISA）

本文中的阳性克隆筛选、抗体效价测定、亲和常数测定、交叉反应值及植物内ZR的测定都是采用ELISA法。其基本步骤为a.结合抗原的包被；b.非特异性吸附位点的阻断；c.抗ZR抗体的免疫吸附反应；d.酶标兔抗鼠球蛋白抗体的免疫吸附反应；e.显色测定。为了防止抗BSA抗体对测定的干扰，我们更换了与包埋抗原偶联的载体。用从重楼属（*Paris* L.）植物中提取的水溶性重楼蛋白（parin）[10]作为载体，与ZR偶联（方法同2）。交叉反应值及样品中ZR的测定时，在加入抗ZR抗体之前，需先加入200μl/孔PBS和50μl/孔不同浓度的交叉反应物或标准ZR浓度，并平衡15分钟。

5. BALB/c鼠的免疫

每只12周龄以上的BALB/c鼠腹腔注射0.4 ml乳化液（含0.2 mg BSA-ZR），初次免疫后第1、2、7、12、23周进行五次强化免疫，方法相同，只是用福氏不完全佐剂代替完全佐剂。第四次强化后一周，鼠尾静脉采血，测效价均大于1万，最后一次强化在融合前三天进行，每只鼠腹腔注射0.3 mg BSA-ZR/0.3 ml PBS,不进行乳化。

6.细胞融合和有限稀释克隆化

基本根据Galfre和Milstein等人[11]的方法进行融合，两次融合的克隆率为36%和19%。用ELISA筛选阳性孔，阳性克隆率为20%和18%，对其中三个强阳性孔进行了3—4次有限稀释克隆化，最后都达到连续二次阳性率为100%。

7.杂交瘤系分泌单抗类型鉴定

各杂交瘤系培养上清经浓缩10—15倍后，用免疫双扩散法鉴定分泌单抗类型。

8.腹水的制备及单抗的纯化

用Brodeur等人[12]的方法制备腹水，并根据Ey的方法对F_2E_6腹水进行亲合纯化。用Campbell[13]的方法对F_3E_6腹水进行纯化，纯化的单抗用SDS-PAGE[14]检测其分子量。

9.抗体亲和常数的测定

根据Friquet等人[15]的方法用ELISA测定纯化F_2E_6单抗与ZR反应的亲和常数。在我们选择的实验条件下，仅有18%的游离抗体结合到固相抗原上。

10.植物内源ZR的提取

玉米幼苗经液氮冷冻粉碎后，每克鲜重加入3 ml 80%甲醇（含10mg/l BHT）提

取液，在 4 ℃下提取过夜(加入 ZR 标样作内标)，离心收集上清液，再重复抽提二次，每次 1 小时，合并提取液，并用七分之一体积重蒸水稀释，过Sep-ParKC_{18}柱，滤液40—50℃减压吹氮除去甲醇和部分水至终体积为 2 ml/g鲜重，用0.1*N*HCl 调pH至 3 — 4，按0.1g/g鲜重加入PVP(聚乙烯吡咯烷酮)，充分振荡十分钟，离心，上清定容至0.5g/ml鲜重，并调pH至7.0，即可 用 于ELISA测定（计算回收率）。

结　果

1.各杂交瘤系分泌单抗的特性

免疫双扩散鉴定结果表明，F_2E_6 分泌的单抗属 IgG_1，F_3G_6、F_1B_9 分泌的单抗属IgM，SDS-PAGE结果也证实了这点（图 1）。IgG_1的重链和轻链的分子量分别为62kD和24kD，IgM的重链和轻链的分子量分别为80kD和26kD。

各杂交瘤系培养上清、腹水以及纯化抗体的效价见表 1 。这三株单抗的腹水在 4 ℃长期贮存或反复冻融数次，效价不变。

表 1　ELISA测定的抗体效价

Table 1 The antibody titers measured by ELISA

克隆系 Clone	培养上清 Culture supernatant	腹　水 Ascites fluid	纯化抗体 Purified antibody
F_3G_6	256/ml	1.0×10^5/ml	2.1×10^4/mg
F_2E_6	1600/ml	1.3×10^6/ml	5.1×10^4/mg
F_1B_9	400/ml	1.0×10^5/ml	—

2.抗体亲和常数的测定

在所测定的抗体浓度范围内，F_2E_6 单抗浓度与测得的光密度值成线性关系。根据三次重复测定（每个抗原浓度有 4 个重复）的结果绘制 Scatchard 图（图 2），均为通过（1、0）点的直线（$\gamma\geqslant0.988>P0.001$），求得平均亲和常数为$Ko=2.36\pm0.99\times10^{-8}$M（用解离常数表示）。

3.抗体检测灵敏度测定

ELISA测定结果表明，F_3G_6、F_2E_6单抗对ZR的检测极限均为0.05pmol.，线性测定范围为0.05—50pmol，4 次独立测定的标准曲线，有较好的重复性（图 3 、4）。

4.抗体特异性测定

用ELISA测定了游离ZR类似物与包埋Parin-ZR对F_2F_6、F_3G_6 单抗竞争结合反应的标准曲线，并根据下面公式求得各类似物的交叉反应值，结果见表 2 。

$$交叉反应值=\frac{当B/Bo=0.5时，所需游离ZR的摩尔数}{当B/Bo=0.5时，所需游离ZR类似物的摩尔数}\times100\%$$

式中，Bo—无游离抗原存在时的光密度值；B—游离抗原存在时的光密度值

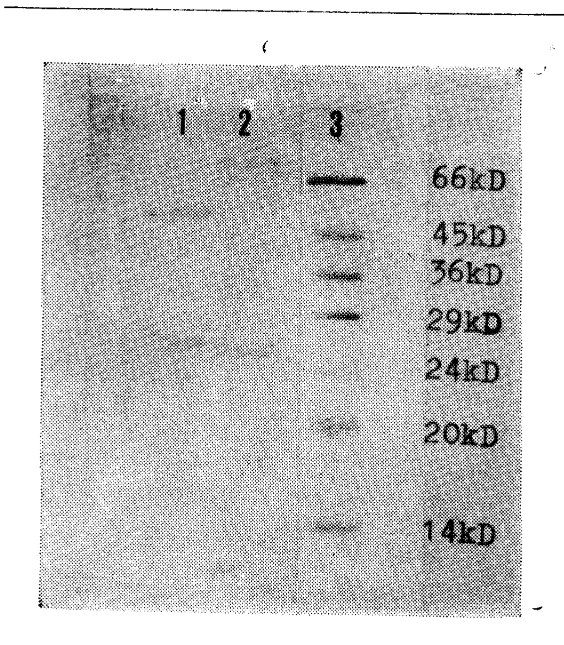


图 1　纯化单抗的SDS—PAGE.

Fig. 1 SDS-PAGE of purified McAb

1. F_2E_6 McAb(IgG_1);

2. F_3G_6 McAb(IgM);

3. standard MW proteins

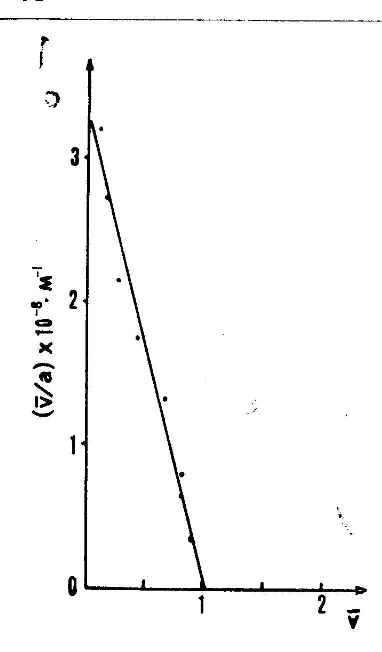


图 2　ZR与F_2E_6单抗反应的Scatchard图

Fig. 2 Scatchard plot of the binding of ZR to F_2E_6 McAb.

$$\bar{V}=\frac{Ao-A}{Ao},\quad \frac{\bar{V}}{a}=\frac{\frac{Ao-A}{Ao}}{a_0-i_0\cdot\frac{Ao-A}{Ao}}$$

Ao. 无游离抗原存在时的光密度值；A. 游离抗原存在时的光密度值；a. 平衡时游离抗原的浓度；a_0. 总抗原的浓度；i_0. 总抗体的浓度$i_0=3.1\times10^{-10}$M. 反应在20℃下进行。

表 2　抗ZR单克隆抗体的交叉反应值（以摩尔数计算）

Table 2　Cross-reactivities of ZR-McAb calculated on molar basis

克隆系 Clone	交叉反应物质 Cross-Reactant						
	ZR	t-Z*	c-Z*	IPA	6-BA	Adenosine	KT
F_2E_6	100	32.11	4.63	0.172	0.026	0.004	0.018
F_3E_6	100	49.87	1.44	0.058	0.145	0.004	0.017

* t-Z，反式玉米素. c-Z，顺式玉米素

5. 植物内源ZR类激素的测定

激素提取过程的回收率　用内标法测定了整个激素提取和粗纯化过程的回收率为62%，其中用PVP处理一步的回收率大于70%。

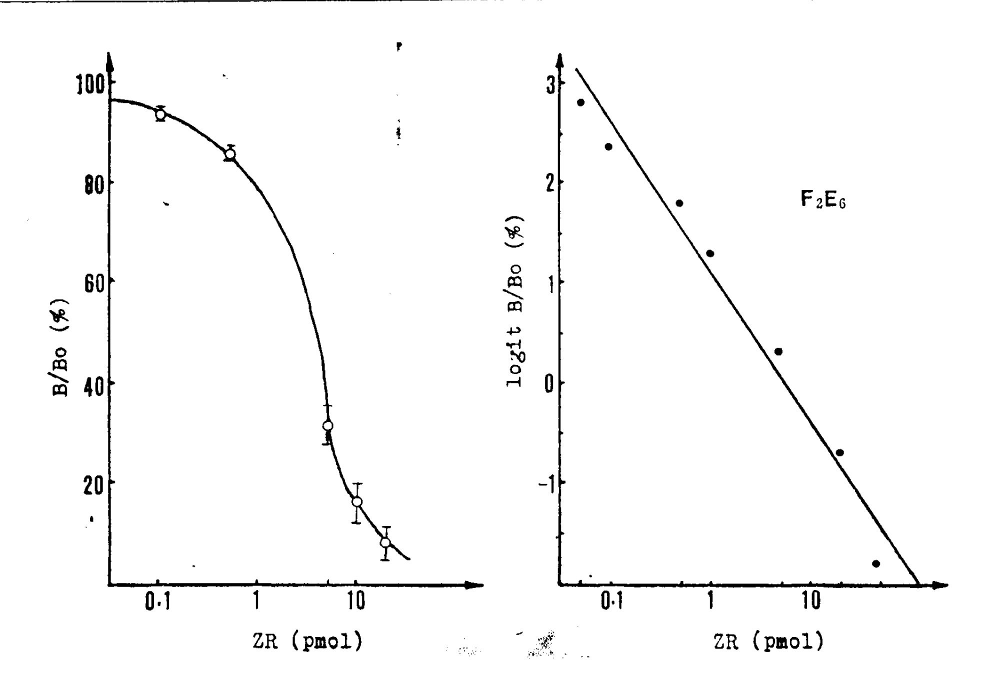


图 3　以F_2E_6单克隆抗体为基础的ELISA对ZR测定的标准曲线，其中（Φ）代表 4 次独立标准曲线的标准差。

Fig. 3　Typical standard curves for F_2E_6 mcAB ELISA for ZR. Bars(Φ)represent standard deviation from n = 4 independent standard curves.

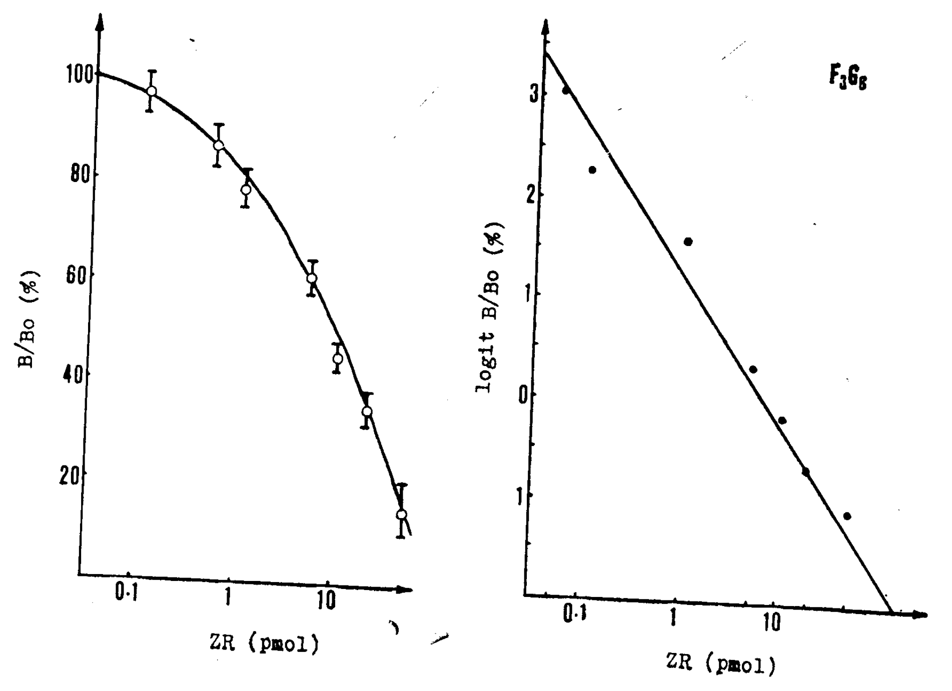


图 4　以F_3G_6单克隆抗体为基础的ELISA对ZR测定的标准曲线，其中（Φ）代表 4 次独立标准曲线的标准差。

Fig. 4　Typical standard curves for F_3G_6 mcAB ELISA for ZR. Bars(Φ) represent standard deviation from n = 4 independent standard curves.

ELISA测定的精确度 用此方法对黄化玉米幼苗提取液中玉米核苷类进行了测定，四个平行样内容的平均偏差为2.3±1.1%，平均变异系数为4.8±1.3%（n = 9），但平行样间的变异系数偏高，可达7.8%或更高。

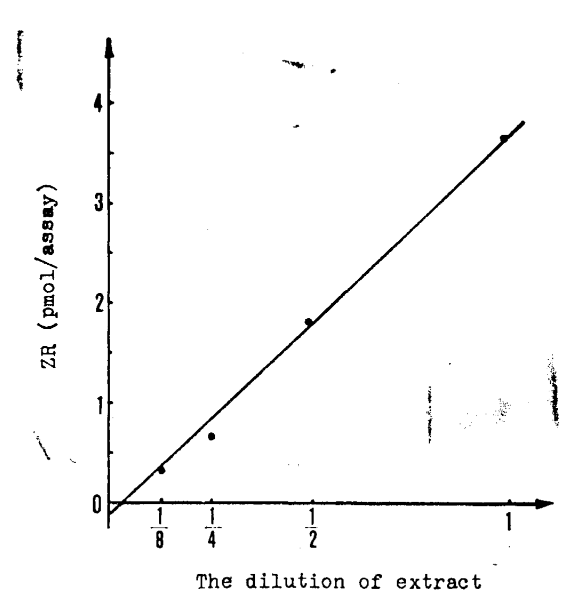


图 5 样品提取液的稀释曲线
Fig. 5 Dilution curve of plant extracts

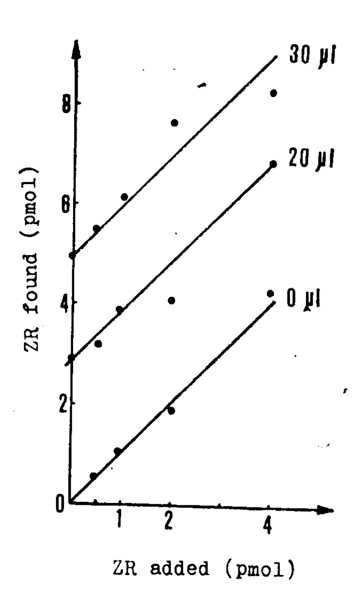


图 6 含提取液组分的ZR浓度梯度的稀释分析
Fig. 6 Dilution analysis of ZR containing fraction of extracts

提取液的稀释分析 不同稀释度的样品提取液中 ZR 的含量与稀释倍数呈很好的线性关系（Y≥0.995，图 5）。在一系列ZR标准浓度梯度中加入20μl、30μl提取液后，测其 ZR 含量并绘制稀释曲线，发现它们之间、以及与未加提取液的标准曲线之间存在较好的平行关系（图 6），这说明此提取液中基本消除了干扰抗原、抗体反应及酶活性的因素，测定结果是准确可靠的。

黄化玉米幼苗中玉米素核苷类的含量 用以F_2E_6单抗为基础的ELISA 法测定了玉米种子萌发初期（第四、五、六天）的幼苗中玉米素核苷类的含量（图 7），因F_2E_6 单抗与玉米素存在一定的交叉反应，故测定的是ZR和 Z 的总含量，以 ZR 的形式计算。

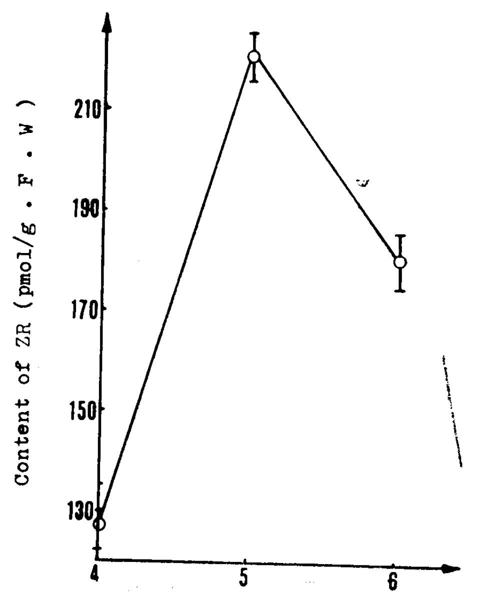


图 7 黄化玉米幼苗中ZR类含量与种子萌发天数的关系
Fig. 7 Relationship between the content of ZR in etiolated maize seedling and days since seed germination

讨　　论

本文报道的三个抗ZR单抗，其中已鉴定的F_2E_6、F_3G_6两单抗的特异性已达到甚至超过已报道的相应多克隆抗体[16]和单克隆抗体[4,5]。特别是对N-6位衍生物的交叉反应值都很低（<0.18%），和其它实验室获得的单抗或多抗一样，对t-Z的交叉反应值较高（F_2E_6为32.11%，F_3G_6为49.87%），这可能与制备免疫原时选择的偶联方式有关[16]。用过碘酸氧化法把ZR通过核糖半分子上的羟基偶联到BSA的ε-NH_2上，这样N-6位上的侧链位于偶联位点的最远端，暴露得最充分，因此可认为是一个优势抗原决定簇，获得的单抗对其特异性最强。由于ZR是一个小子分化合物，与BSA偶联后，对ZR的抗原决定簇很少，所以获得的多克隆抗体在对t-Z的交叉反应上与单抗相似，而在对N-6位衍生物的交叉反应上，因多抗中含一定量的对非侧链部位的弱抗原决定簇的抗体，因而交叉反应值较高。通过改变免疫原的偶联方式以及阳性克隆筛选方法，可望获得高特异性的抗ZR抗体或组特异性抗体。

以F_3G_6、F_2E_6单抗为基础的包埋抗原ELISA对ZR的检测灵敏度已达到或超过已报道的以单抗或多抗为基础的放射免疫试法[4,5,16]和以多抗为基础的酶标免疫试法[16,17]，略低于Eberle等人[5]报道的以单抗为基础的双抗体ELISA，我们通过选择合适的ELISA条件，使检测区界加宽（0.05—50 pmol），包埋抗原的ELISA，避免了样品液与酶标物的直接接触，防止了样品液中某些物质对酶活性及抗原抗体反应的干扰。

我们获得的单抗虽对N-6位衍生物的交叉反应较低，但与玉米素仍有较高的交叉值，因此测定的是玉米素核苷和玉米素的总含量。要测定ZR的单独含量，还必须结合适当的分离技术，HPLC具有快速、高效等优点，是理想的分离手段。

制备单抗对免疫原的纯度要求不高，且用量较少，这就为含量少难以纯化的激素的检测和纯化创造了条件。单抗在植物激素研究中的应用刚刚起步，已取得了较大进展，它不仅被用于激素的测定中，也被用于激素的亲和纯化[18]、激素的免疫组织化学定位[19]等研究中，深信以单抗为基础的免疫化学技术在植物激素研究中的应用将会加速这一领域的进展。

致谢　在论文工作中，得到中国医科院医学生物所张和君、傅家忠二位老师的大力帮助；医学生物所唐恩华老师帮助鉴定部分单抗类型；上海细胞所叶敏教授赠送SP2/0骨髓瘤系。

参 考 文 献

1　Brenner M L. *Ann Rev Plant Physiol* 1981; 32: 511—538

2　Mertens R, Eberle J, Arnscheidt A et al. *Planta* 1985; 166: 389—393

3　Mertens R, Weiler E W. *FEBS Letters* 1983; 160: 269—272

4　Trione E J, Krygier B B, Banowetz G M et al. *J Plant Growth Regul* 1985; 4: 101—109

5　Eberle J, Arnscheidt A, Klix D et al. *Plant Physiol* 1986; 81: 516—521

6　Erlanger B F, Beiser S M. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964; 52: 429—436

8 Hurn B A L, Chantler S M. Methods in Enzymology Vol. 70. Academic Press, 1980: 124—125
9 蒋成淦. 酶免疫测定法. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 38—41
10 季本仁, 李恒, 冯唯诚等. 云南植物研究 1986; 8 (3): 323—332
11 Galfre G, Milstein C. Methods in Enzymology Vol. 73. Academic Press, 1981: 3—46
12 Brodeur B R. *J Immunol Meth* 1984; 77: 265—272
13 Campbell A M. Monoclonal antibody technology. Amsterdam New York Oxford, 1984: 101—184
14 Laemmi U K. *Nature* 1970; 227(5259): 680
15 Friguet B, Chaffotte A F, Ohaniance L D et al. *J Immunol Meht* 1985; 77: 305—319
16 Weiler E W, Eberle J, Mertens R et al. Immunology in Plant Science. Cambridge University, 1985: 28—57
17 徐如绢, 季本仁, 段金玉. 云南植物研究 1986; 8 (3): 333—342
18 Macdonald E M, Morris R O. *Plant Physiol* suoplement 1983; 72: 26
19 Eberle J, Wang T L, Cook S et al. *Planta* 1987; 172: 289—297

THE PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ZEATIN RIBOSIDE AND THE DETECTION OF ENDOGENOUS CYTOKININS BY ENZYME-LINKED IMMUNOABSORBENT ASSAY (ELISA)

Zhang Long, Ji Benren, Duan Jinyu
(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming*)

Abstract Three hybridomas, F_2E_6, F_1B_9, F_3G_6, which secreted monoclonal anti-zeatin riboside antibodies, were produced from two successive fusions of BALB/c spleen cells with Sp2/0 myeloma cells. The mice had been hyperimmunized with zeatin riboside-bovine serum albumin conjugate for about 6 months and the positive hybridomas were screened by indirect enzyme-linked immunoabsorbent assay. Among these hybridomas, F_2E_6 secretes antibody of the IgG_1, both F_3G_6 and F_1B_9 secrete the IgM. Two of the monoclonal antibodies, F_2E_6, F_3G_6, were characterized by ELISA and found that the detection limits were 0.05 pmol (~18pg) of zeatin riboside and the measuring ranges extended from 0.05—50 pmol. Competitive binding trials against trans-Zeatin, cis-Zeatin, Isopentenyladenosine, 6-Benzylaminopurine, 6-Furfurylaminopurine, and Adenosine showed that except Zeatin, the cross-reactivities towards these structurally related cytokinins were negligible (less than 0.18%). So these monoclonal antibodies have high specificity. The affinity constnt of F_2E_6 monoclonal antibody, measured by ELISA, was 2.36×10^{-8}M, which indicates that this monoclonal antibody has high affinity for zeatin riboside. The use of immobilized antigen ELISA in plant cytokinin detection was discussed and the content of cytokinins (calculated as zeatin riboside) in etiolated *Zea mays* L. seedling extracts was analysed with a little handlement. The method reported here not only has high sensitivity and specificity, but also has the advantages of being simpler safer, time-saving (3 hours), requiring less expensive equipment and handling a lot of samples simultaneously, so which is worth being spread widely.

Key words Monoclonal antibody; Zeatin riboside; Cytokinins; ELISA